

PAT-NO: JP407265097A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 07265097 A
TITLE: DETERMINATION OF IRON
PUBN-DATE: October 17, 1995

INVENTOR-INFORMATION:
NAME
UMEMOTO, MASAO

ASSIGNEE-INFORMATION:
NAME
UMEMOTO MASAO

COUNTRY
N/A

APPL-NO: JP06096864
APPL-DATE: March 30, 1994
INT-CL (IPC): C12Q001/26

ABSTRACT:

PURPOSE: To enable high-sensitivity determination of iron under mild conditions simply in a shortened time by generating hydrogen peroxide through an enzyme reaction, oxidizing divalent iron into trivalent iron with the hydrogen peroxide in the presence of a reducing agent and determining the corresponding change in the hydrogen peroxide.

CONSTITUTION: An aqueous chelate such as EDTA or the like is added to a sample from living body to release iron from iron-binding proteins such as transferrin, albumen or globulin. Then, 4-aminocantipyrine, ascorbic acid as a reducing agent and glucose oxidase are added, then glucose and peroxidase are admixed thereto to liberate hydrogen peroxide so that the divalent iron is

oxidized into the trivalent iron by the hydrogen peroxide in the presence of a reducing agent. Then, the change in hydrogen peroxide corresponding to the iron oxidation is determined with the peroxidase-4-aminoantipyrin system whereby high-sensitive determination of iron in a sample can be done.

COPYRIGHT: (C)1995, JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-265097

(43) 公開日 平成7年(1995)10月17日

(51) Int.Cl.⁴

C 1 2 Q 1/28

識別記号

序内整理番号

6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数5 書面 (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平6-96864

(22) 出願日

平成6年(1994)3月30日

(71) 出願人

583218716

梅本 雅夫

埼玉県北葛飾郡杉戸町清池五丁目20番16号

(72) 発明者

梅本 雅夫

埼玉県北葛飾郡杉戸町清池五丁目20番16号

(54) 【発明の名称】 鉄の定量方法

(57) 【要約】

【目的】高感度な鉄の定量法を提供する

【構成】水性媒体中、2価鉄イオンを含む試料と、還元剤共存下、オキシダーゼ反応により生成させた過酸化水素とを接触反応させ、対応する過酸化水素変化量をオキシダーゼ検出反応等、高感度な過酸化水素検出法により定量すること特徴とする鉄の測定方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】還元剤の共存下に2価鉄から3価鉄への酸化を行わせそれに対応する変化量を定量する鉄の分析法

【請求項2】過酸化水素を発生させ、還元剤の共存下、過酸化水素による2価鉄から3価鉄への酸化を行わせ、対応する過酸化水素量の変化量を定量する請求項1に記載する鉄の分析法

【請求項3】過酸化水素発生法がオキシゲナーゼ酵素反応であり、過酸化水素定量方法がオキシゲナーゼ検出反応である請求項2に記載する鉄の分析法

【請求項4】鉄キレート剤を共存させる請求項2及び請求項3に記載する鉄の分析法

【請求項5】トランスフェリン、アルブミン、グロブリン等の結合タンパクから、鉄を水性キレート剤を用いて遊離させオキシドレゼクターゼ酵素反応を行う鉄の定量方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、酵素反応により発生させた過酸化水素が還元剤共存下2価鉄イオンにより増幅して消費されることを利用した極めて高感度な鉄の定量方法に関する。

【0002】

【従来の技術】微量鉄イオンの分析法としては、ピリジン、O-フェナントロリン、バソフェナントロリン、トリピリジリトリアミン、チオグリコール酸、チオンなどをを用いる比色法がある。しかし、これらの方法は有機溶媒抽出を利用したり、反応、発色の条件が温和ではないため、酵素反応のような、簡便かつ迅速な測定には不適である。酵素反応を用いる鉄イオンの測定法としては、アコンターゼが鉄イオンにより活性化されることを利用した方法が報告されている（第32回日本臨床化学会年會要旨集p56b）。

【0003】2価鉄イオンが過酸化水素を還元することは周知のことであり、このことを利用して2価鉄イオンを求めることができる。電気化学的に鉄を測定する方法があり、鉄のグロメトリとして古くから知られている。しかし、これらの方法では感度は悪く微量の鉄の分析には適さない。これらの方法以外により、鉄を高感度に検出する方法の発明が求められている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】最終液中濃度としてppt (ng/ml) という微量の鉄イオンを検出するには、2価鉄イオンによる過酸化水素還元作用の増幅と対応する微量の過酸化水素の変化量を高感度に検出する方法が用いられなければならない。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、水性媒体中、酵素反応又は電気化学的方法により過酸化水素を発生さ

2

せ、還元剤の共存下発生させた過酸化水素と2価鉄とを反応させ、過酸化水素の変化量を過酸化水素発色反応又は電気化学的方法により検出することと特徴とするものである。本発明が対象とする鉄濃度は極めて微量であるため、単に2価鉄により消費される過酸化水素量はわずかなため、電気化学的及び吸光光度法等では検出できず、微量鉄の測定方法としては無効である。本発明は、2価鉄に微量の還元剤を共存させれば、協同作用的に過酸化水素が消費され、高感度に鉄を定量できることを見いだしたことにともづく。

【0006】ここに、水性媒体とは緩衝液、生理食塩水等の水を含有する液を表し、緩衝液としてはトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン—塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、グッド緩衝液、バルビタル緩衝液等が代表的である。鉄の還元剤としては $Fe^{2+} + e \rightarrow Fe^{3+}$ 系の酸化還元電位の見掛け電位より低いものを用いる。アスコルビン酸、塩酸ヒドロキシルアミン、チオ硫酸ナトリウム、チオグリコール酸、ヒドロキノン、硫酸ヒドラジンなどがある。特にヒドロキシルアミンとその塩、ヒドラジンとその塩は、ペルオキシゲナーゼ反応を阻害せず、かつ、過酸化水素の消費反応が速いので、優れた還元剤である。又、アスコルビン酸はアスコルビン酸オキシゲナーゼにより消費できるため、過酸化水素生成—発色反応の前に大部分を消費することができる。なお、ヒドロキシルアミンもヒドロキシルアミン脱酸素酵素により消費できる。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元体（NADH）とフェリシアンイオンからジシアロラーゼ反応により生成したフェロシアンイオンを還元剤として用いることもできる。この場合は、フェロシアンイオンの過酸化水素消費速度は速い。

【0007】過酸化水素生成反応としては、電気化学的な方法もあるが基質と酸素により過酸化水素を生成するオキシゲナーゼ酵素反応が最も適している。この場合、直接過酸化水素を生成しないが、最終的にオキシゲナーゼ酵素反応に結びつけられるすべての酵素反応が含まれる。オキシゲナーゼ酵素反応のうち、生体試料等に含まれる物質を基質とし、よく用いられる方法としては、グルコースオキシゲナーゼ法、コレステロールオキシゲナーゼ法、ガラクトースオキシゲナーゼ法、グリセロールオキシゲナーゼ法、尿酸オキシゲナーゼ（ウリカーゼ）法などがある。一般には用いられないがアミノ酸オキシゲナーゼ法、アミノ酸オキシゲナーゼ法、アルデヒドオキシゲナーゼ法、グルタミン酸オキシゲナーゼ法、グリコールオキシゲナーゼ法、ヒドロロパット酸オキシゲナーゼ法、ピルビン酸オキシゲナーゼ法、尿酸オキシゲナーゼ法、モノアミンオキシゲナーゼ法、ヘキソースオキシゲナーゼ法、モノアミンオキシゲナーゼ法、ラクトステロールオキシゲナーゼ法、リジンオキシゲナーゼ法、シュウ酸オキシゲナーゼ法、ヒドロキノンオキシゲナーゼ法などがある。

【0008】生体試料中には存在しないか、微量であっても、かつ基質、酵素共に長期安定であるものとしては、

50

5

酸化水素を生成する方法を用いる場合は、オキシダーゼかその基質をこのときの水性媒体に共存させてもよい。例えば、塩化コリン等0.1~1.0mg/mlに加えておく。又、発色反応の基質を加えておいてもよい。例えば、4-アミノアンチピリン等を0.05~1mg/mlを加えておく。次に残りの基質、オキシダーゼ反応の酵素及び発色反応の酵素を含む水性媒体を上述の液に加え、生じる吸光度変化量を求め、鉄の量を求める。オキシダーゼ酵素としては0.2~2.0U/ml、発色反応としてベルオキシダーゼを0.1~2.0U/mlを用いる。この酵素量は還元剤の種類に依存し、塩酸ヒドロキシルアミン、硫酸ヒドラジンなどの場合は少量でよい。残りの基質としては、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン0.1~2mg/mlを加える。この過酸化水素生成、発色反応は酵素反応として適切な条件であるpH6~7、温度8~50℃で行う。

【0015】水性媒体のpHとしては、2価鉄が酵素により3価鉄に酸化されるのを防ぐため、3価鉄から2価鉄への還元は酸性とするのがよい。この場合、強い緩衝作用の水性媒体とし(水のみでもよい)、次の反応過程における強い緩衝液により、反応に適切なpHとなるようにする。過酸化水素生成及び検出過程を酵素反応で行う場合は緩衝液のpHは5~8とし、特にpH6.0~7.5が望ましい。

【0016】文献によるとアスコルビン酸は6mg/dlの割合で加えるのが望ましいとあり、3価鉄を還元後、オキシダーゼ反応を行う。アスコルビン酸はアスコルビン酸オキシダーゼを発色反応系に加えることにより、アスコルビン酸が消費されると同時に発色がおきる。この場合、微量に残存するアスコルビン酸は還元剤として2価鉄と協同効果を発揮する。

【0017】オキシダーゼ反応は、一定量の過酸化水素を生成させた後、検出過程を行う場合と、両方を同時に行う場合とがある。前者は試料中に共存する過酸化水素消費物質が多量に存在している、正確に鉄が測定できるという画期的な利点を有する。すなわち、試料中に例えばアスコルビン酸、尿酸、ビリルビンなどの還元性物質が多量に存在している、鉄の還元剤を加えないで通常の反応を行えば鉄は反応に関与しないためそのプランクのみが定量される。次に、鉄の還元剤を加えて一連の反応を行い、両者を差し引けば鉄の定量ができる。この方法は、血清、血しょうのようにアスコルビン酸などが共存しているも酵素作用により鉄は3価として存在する試料に対して極めて有効である。

【0018】生体試料については、オキシダーゼ反応における基質が試料中に含まれている場合はその消費反応を行う必要がある。例えばグルコースオキシダーゼを用いる場合は、グルコースオキシダーゼをもって、内因性のグルコースを消去するか、ヘキシナーゼをもって消

6

去する。ヘキシナーゼを用いる場合は、オキシダーゼ反応と競合するため、マグネシウムキレート剤等の阻害剤を加えて失活させる必要がある。本発明における鉄キレート剤の多くはマグネシウムキレートともなるので、キレート剤の利用は極めて優れた方法といえる。

【0019】鉄を蛋白から分離させるキレート剤はオキシダーゼ反応と共存させてもよい。次のオキシダーゼ検出反応時に共投与してもよい。後者の場合は、鉄をあらかじめトランスフェリン、アルブミン等から分離させておいてもよい。この目的には、液のpHを2~4とする。

【0020】他の方法及び、他の酵素法で困難であった血清の鉄結合能も本発明によれば簡単に測定できる。その原理を以下に示す。まず、上述した方法における、鉄キレート剤を共存させて、血清鉄を定量する。次に、血清に鉄イオンを過剰量加えて、鉄キレート剤を共存させないで鉄を定量する。この場合、蛋白は鉄により飽和し、その分は反応しないので、遊離の鉄イオンのみが測定される。加えた鉄量から血清鉄及び遊離の鉄量を差し引けば鉄結合能が求められる。

【0021】本発明では強い還元剤であるアスコルビン酸等を用いた場合、銅の影響を若干うける。銅については試料中の銅と同量の硝酸銅を求めて加えることもよい。もしくは、バクアフロインなど、銅と特異的に沈降物を生じる試薬を加える。尿酸、ビリルビンの還元性物質はそれぞれ尿酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼにより消去後発色反応を行う。この場合、消去反応で生成した過酸化水素は鉄の還元剤によって消失し、発色反応に影響しない。

【0022】

【実施例】

【実施例1】

グルコースオキシダーゼとアスコルビン酸を用いる方法
(1)鉄検量線用標準液の調製

硫酸第二鉄(和光純薬工業製)を蒸留水で希釈し、塩酸を一滴加えた後定容し、2.5、5、10μg/mlの鉄(11)検量用標準液を調製した。ただし、別に原子吸光光度法により、和光純薬工業製鉄標準液を対照として濃度を測定し補正係数を求めた。

(2)鉄の定量

試験管に鉄検量用標準液0.10mlをとり、4-アミノアンチピリン0.1mg/ml、アスコルビン酸0.08mg/ml、及びグルコースオキシダーゼ(Aspergillus niger、和光純薬工業製)30U/mlを含む25mM酢酸緩衝液(pH5)1.0mlを加え37℃で5分間インキュベートする。次に、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)0.6mg/ml、グルコース0.05mg/ml、ベルオキシダーゼ(西澤おさむ由来、和光純薬工業製)10U/ml、アスコ

ルビン酸オキシダーゼ（キュリ由来、和光純薬工業製） $10\text{U}/\text{ml}$ を含む 100mM グッド緩衝液（HEPES、 $\text{pH}6.8$ ） 2.0ml をあらかじめ 37°C にインキュベートしたものを上述の溶液に加え、吸光度変化を分光光度計（日立製UV3400）で測定した。得られた検量線を図1に示す。本法では試料中にグルコースが少量含まれていてもグルコースオキシダーゼにより分解されて過酸化水素となり、これはさらにアスコルビン酸により還元されて色色には影響しない。しかし、グルコースが相当量になるとアスコルビン酸が不足し、誤差となる。又、試料にアスコルビン酸が多量に含まれている場合も発色反応に影響する。アスコルビン酸オキシダーゼは多い程高精度な結果が得られる。

【0023】

【実施例2】

コリンオキシダーゼとアスコルビン酸を用いる方法

（1）鉄検量線用標準液の調製

実施例1と同じようにして、 125 、 250 、 375 、 $475\mu\text{g}/\text{dl}$ を調製した。

（2）鉄の定量

試験管に鉄検量線用標準液 0.080ml をとり、これに4-アミノアンチピリン $0.1\text{mg}/\text{ml}$ 、塩化コリン $0.4\text{mg}/\text{ml}$ 、アスコルビン酸 $0.12\text{mg}/\text{ml}$ を含む 200mM 酢酸緩衝液（ $\text{pH}2$ ） 1.0ml を加え 37°C で5分間インキュベートする。次に、EMSE $0.6\text{mg}/\text{dl}$ 、ベルオキシダーゼ（西洋わさび由来、オリエンタル酵母製） $10\text{U}/\text{ml}$ 、コリンオキシダーゼ（アルカリゲネス由来、和光純薬工業製） $6\text{U}/\text{ml}$ 、アスコルビン酸オキシダーゼ $8\text{U}/\text{ml}$ 由来、和光純薬工業製） $3\text{U}/\text{ml}$ を含む 200mM グッド緩衝液（ $\text{pH}7$ 、 0.25°C ）を 37°C にインキュベートしたもの 2ml を上述の溶液に加え、1分後及び3分後の吸光度を分光光度計（日立製UV3400）で測定し、両方の吸光度差を計算した。得られた検量線を図2に示す。本法では、 $\text{pH}2$ の溶液と試料を混合し、 37°C で5分間インキュベートすることにより、コロイド状の水酸化鉄、コロイド状の酸化鉄をも分解し、定量できる。本法はエンドポイント法であるが、塩化コリンを数倍量とすることにより速度法が可能である。終点法は速度法が塩化コリンと、コリンオキシダーゼ量に依存する。アスコルビン酸が多量に加えてあるのは、 0.5 分後の吸光度を空試験値とするためである。にこりのない試料については、アスコルビン酸は少量でよい。

【0024】

【実施例3】

グリセロール-3-リン酸オキシダーゼと塩酸ヒドロキシルアミンを用いる方法

（1）鉄検量線用標準液の調製

試薬特級硫酸第一鉄（和光純薬工業製）を蒸留水で定容し、 125 、 250 、 $375\mu\text{g}/\text{dl}$ の鉄（I）検

量線用標準液を調製した。

（2）鉄の定量

試験管に鉄検量線用標準液 0.030ml をとり、これに4-アミノアンチピリン $0.3\text{mg}/\text{ml}$ 、塩酸ヒドロキシルアミン $0.15\text{mg}/\text{ml}$ 、グリセロール-3-リン酸 $1.5\text{mg}/\text{ml}$ を含む水溶液（ $\text{pH}2$ 、 5.25°C ） 1.0ml を加え 37°C にインキュベートする。次に、EMSE $0.3\text{mg}/\text{ml}$ 、ベルオキシダーゼ（西洋わさび由来、和光純薬工業製） $0.4\text{U}/\text{ml}$ 、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ（マイクロローガニズム由来、EC1.1.3.21、ペーリンガーマンハイム製） $1.5\text{U}/\text{ml}$ 、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム $5\text{mg}/\text{ml}$ を含む 200mM グッド緩衝液（ $\text{pH}7$ 、 5.25°C ） 2.0ml をあらかじめ 37°C にインキュベートしたものを、上述の溶液に加え、生じる吸光度変化（ 0.2 から 0.7 分の 0.5 分間）を分光光度計（日立製UV3400）で測定した。検量線を図3に示す。次に血清 0.030ml をとり、同様に測定した結果、測定値は $95\mu\text{g}/\text{dl}$ であった。この血清をバソフェナンスロリン吸光度法で測定した結果は $92\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、極めてよく一致した。

【0025】

【実施例4】

硫酸ヒドラジンを用いた場合

（1）鉄検量線用標準液の調製

実施例3と同じであるが、濃度系列を 2 、 4 、 6 、 0 、 12 、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

（2）鉄の定量

試験管に鉄検量線用標準液 0.10ml をとり、これに4-アミノアンチピリン $0.2\text{mg}/\text{ml}$ 、塩化コリン $0.6\text{mg}/\text{ml}$ 、硫酸ヒドラジン飽和水（ 20°C ） $0.04\text{ml}/\text{ml}$ を含む水溶液（ $\text{pH}2$ 、 5.25°C ） 2.0ml を加え 25°C で5分間インキュベートする。次に、EMSE $1\text{mg}/\text{ml}$ 、ベルオキシダーゼ（西洋わさび由来、和光純薬工業製） $0.5\text{U}/\text{ml}$ 、コリンオキシダーゼ（アルカリゲネス由来、和光純薬工業製） $1.1\text{U}/\text{ml}$ を含む 200mM グッド（HEPES）緩衝液（ $\text{pH}7$ 、 0.25°C ）を 25°C にインキュベートしたもの 1ml を、上述の溶液に加え、 0.5 分後から 2.5 分後の吸光度を分光光度計（日立製UV3400）で測定し、両方の吸光度差を計算した。得られた検量線を図4に示す。

【0026】

【発明の効果】本発明の効果は次のとおりである。本発明では酵素反応を利用しているので、温和な反応条件で簡便かつ短時間に鉄の測定が可能である。又、酵素反応により、過量の過酸化水素を移出と同一の溶液中で発生させることが可能であり、反応中鉄濃度として ppt （ ng/ml ～ pg/ml ）という極めて高い感度が得られる。又、試料中濃度としては図3から吸光度変化

9

0.001を与える数ppb(数 $\mu\text{g}/\text{dl}$)が検出可能である。本発明で用いる酵素は鉄を補酵素としないので、鉄キレート剤を共存させることが可能であり、鉄を補酵素とする方法に比較して温和、簡便な過程にて鉄を定量できる。この特徴を生かし、他の方法、他の酵素法では困難であった血清における鉄結合能をも簡単に測定できる。定電位クロマトリーにより、2価鉄を3価鉄に酸化して鉄を定量する方法において、還元剤を共存させることにより、本発明の増幅効果により高感度定量が可能となる。本発明の原理は、銅、マンガンなど微量の

10

酸化還元金属の定量に応用できる。

【0027】

【図面の簡単な説明】

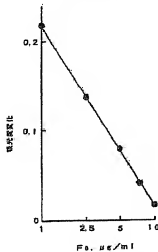
【図1】グルコースオキシダーゼを用いたときの鉄の検量線

【図2】コリンオキシダーゼを用いたときの鉄の検量線

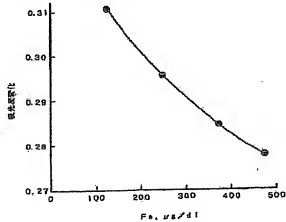
【図3】グリセロール-3-リン酸オキシダーゼを用いたときの鉄の検量線

【図4】硫酸ヒドラジンを用いたときの鉄の検量線

【図1】



【図2】



【図3】

